

10/512133

Rec'd PTO

22 OCT 2004

INPI

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

REC'D 14 JUL 2003

WIPO

PCT

PCT/FR03/01231

BREVET D'INVENTION

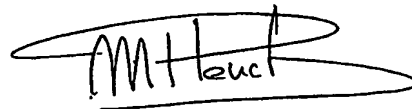
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 AVR. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Important

Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

28 AVRIL 2002 DATE 75 INPI PARIS LIEU 0205049 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 23 AVR. 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) SGimF644/73FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date ____/____/____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISÉS PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORES, LEUR PROCÉDE DE PRÉPARATION ET APPLICATIONS.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	3, rue Michel Ange	
	Code postal et ville	75016 PARIS	
Pays		FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE EN DÉPÔT DATE 20 AVRIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0205049 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		SGimF644/73FR	
6 MANDATAIRE			
Nom		ORES	
Prénom		Béatrice	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	6, avenue de Messine	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 45 62 75 00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 45 62 04 86	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N°92-4046		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La présente Invention est relative à des supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés, à leur procédé de préparation, à leur utilisation pour la préparation de biopuces et aux applications de ces biopuces, en particulier pour l'immobilisation de macromolécules, notamment de macromolécules biologiques telles que des acides nucléiques, des lipides, des protéines (peptides, enzymes, anticorps, ...) ou leurs partenaires moléculaires.

Le développement exponentiel de la génomique et de la pharmacogénomique lié au séquençage non seulement du génome humain, mais également à celui d'animaux, de bactéries, de virus, de plantes, etc... amène les laboratoires de recherche académiques ou industriels à consommer de manière massive des biopuces fiables, faciles à fabriquer.

Or, dans ce cadre particulier, il est primordial de pouvoir disposer de supports solides fonctionnalisés présentant un certain nombre de qualités.

Ces supports doivent en particulier permettre l'immobilisation reproductible de molécules d'intérêt, dans la mesure où une immobilisation reproductible est conditionnelle d'une détection elle-même reproductible.

Ces supports doivent également permettre l'immobilisation des molécules d'intérêt de façon sensible. La sensibilité d'un support solide fonctionnalisé dépend du taux d'immobilisation et de la méthode de détection d'un signal, mais aussi et surtout du niveau du bruit de fond (signal non spécifique). Une diminution du bruit de fond améliore le rapport signal/bruit. En effet, dans un dispositif dans lequel on détecte la présence d'espèces biologiques au voisinage de la surface, le bruit de fond vient essentiellement de l'adsorption non spécifique de molécules y compris de molécules biologiques d'intérêt marquées et qu'il convient par conséquent de limiter. L'idéal est donc d'obtenir un support qui possède un bruit de fond très bas et une intensité de détection du signal élevée.

D'autre part, et notamment dans le cas particulier des réactions d'hybridation mettant en œuvre des acides nucléiques, l'accrochage des sondes sur la surface d'un support solide doit garantir l'intégrité de la séquence et la stabilité du dépôt. Après l'étape d'hybridation les résultats doivent être reproductibles d'un support
5 à l'autre. A cet effet, les sondes doivent être espacées de la surface du support solide afin de ne pas perturber l'hybridation avec les acides nucléiques cibles. Ceci permet de s'approcher des conditions d'hybridation en solution en mimant une hybridation en 3 dimensions plutôt qu'en 2 dimensions classiquement obtenues par la technique lame de verre. Un espaceur d'au moins une quarantaine d'atomes (4-5 nm) est nécessaire
10 pour éviter les contraintes stériques entre l'ADN et la surface du support.

Par ailleurs, il est important de pouvoir disposer de supports solides fonctionnalisés réutilisables. La possibilité de pouvoir disposer d'un support réutilisable est d'un grand intérêt car elle autorise l'analyse de plusieurs échantillons biologiques avec un seul et même dispositif, ce qui permet d'effectuer des
15 comparaisons quantitatives. De plus, les supports réutilisables autorisent la réalisation de plusieurs mesures sur un même échantillon et permettent ainsi l'amélioration des résultats d'un point de vue statistique.

A l'heure actuelle, différents types de procédés de préparation des biopuces ont déjà été proposés.

20 Les biopuces, et en particulier les biopuces à acides nucléiques, peuvent être fabriquées soit par synthèse *in situ* soit par immobilisation de sondes.

Dans le premier cas (synthèse *in situ*), les sondes sont des oligonucléotides qui sont synthétisés étape par étape directement sur le support et qui ont une taille généralement comprise entre 20 et 30 bases. Ce procédé de fabrication
25 permet d'avoir accès à des puces à haute densité (McGall *et al*, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 5081-5090).

Dans le deuxième cas (immobilisation de sondes), les sondes sont présynthétisées puis immobilisées sur le support. Deux types d'interactions avec la surface peuvent alors entrer en jeu.

L'acide nucléique sonde peut être maintenu sur la surface par des interactions électrostatiques entre les groupements phosphates du squelette chargés négativement et la surface modifiée du support chargée positivement. A titre d'exemple, ce type de biopuce peut être obtenu par recouvrement de la surface avec de la poly-L-lysine ou par silanisation avec un amino-silane (Zammatteo *et al*, Anal. Biochem., 2000, 280, 143-150 ; Eisen *et al*, Methods in Enzymol, 1999, 303, 179-205). Dans ce type d'immobilisation, la sonde est généralement couchée sur le support ce qui peut entraîner des problèmes d'accessibilité lors de l'étape d'hybridation. De plus, ce mode d'interactions ioniques n'est pas suffisamment stable pour permettre une réutilisation de la biopuce.

L'acide nucléique sonde peut également être greffé sur le support par le biais d'interactions covalentes. Généralement les liaisons entre les sondes et le support sont établies par une des extrémités 3' ou 5' de l'acide nucléique permettant une accessibilité de la sonde sur toute sa longueur d'où une meilleure qualité de la réponse en terme d'hybridation. Plusieurs combinaisons de fonctionnalisation du support et des acides nucléiques peuvent être rencontrées. Le support peut, par exemple, comporter des fonctions nucléophiles telles que des fonctions $-NH_2$ ou $-SH$ et l'acide nucléique à greffer comporte alors une fonction électrophile telle que par exemple une fonction $-CHO$, $-NCS$, $-NHS$ ou encore $-COOR$, et inversement. Selon une autre variante, le support et l'acide nucléique peuvent être nucléophiles et un espaceur di-électrophile permettra le couplage entre les deux entités. Enfin le support et la sonde peuvent être électrophiles et le couplage sera réalisé grâce à un espaceur di-nucléophile.

Les biopuces fabriquées actuellement sont, pour une très grande majorité, réalisées en utilisant le verre comme support.

Les plus utilisées possèdent des surfaces fonctionnalisées avec un espaceur terminé par une fonction $-NH_2$. Leur efficacité en terme d'accrochage et d'hybridation a été confirmée mais aucune réutilisation de ce type de lame n'est possible, les interactions entre les sondes et le support étant de type ionique.

D'autres lames comportant à leur surface des fonctions aldéhyde sont commercialisées. Ces fonctions sont introduites par utilisation d'un silane-aldéhyde, espaceur simple, qui ne présente qu'une seule fonction d'ancrage par molécule que ce soit du côté du support ou du côté des acides nucléiques. Or il a été
5 montré que l'ancrage par plusieurs points sur la surface est important (Zhao *et al.*, Nucl. Acids Res., 2001, 29, 955-959 ; demande internationale WO 01/51689) puisqu'il permet d'assurer une augmentation des sites de fixation des sondes sur le support ce qui entraîne une meilleure réponse en terme d'hybridation.

Une autre façon d'obtenir une meilleure sensibilité de détection est
10 notamment reportée dans les travaux de M. Beier et J.D. Hoheisel, Nucl. Acids Res., 1999, 27, 1970-1977. Les auteurs ont construit, sur une lame de verre, des molécules ramifiées à six branches dans le but d'augmenter la densité de sondes. La nature de ces espaceurs ramifiés permet aussi de moduler la nature hydrophile ou hydrophobe de la surface. Leur procédé de préparation inclut au total huit étapes de synthèse, à partir
15 d'une lame aminée, pour obtenir la biopuce ce qui limite fortement leur développement industriel. De plus, les molécules ramifiées sont générées *in situ* de façon non contrôlable, et leur structure n'est pas définie, ce qui ne permet pas de garantir une homogénéité de la surface de la biopuce ainsi obtenue. Tous les liens étant covalents, les auteurs ont montré, que leurs biopuces pouvaient être réutilisées. Il
20 est à noter que la réutilisation des biopuces est courante dans le cas d'un support en Nylon® et a été plus récemment décrite avec du plastique (voir demande internationale WO 00/55627).

Enfin, des travaux récents (Benters *et al.*, Chembiochem., 2001, 2, 686-694) décrivent l'utilisation de dendrimères aminés "PAMAM® starbust" pour la
25 fabrication de biopuces, en sept étapes de synthèse exigeantes en terme de conditions opératoires, et dont certaines ne peuvent être contrôlées puisqu'elles sont réalisées directement sur le verre, pour l'obtention d'un support qui n'est pas stable dans le temps. En effet, l'utilisation de ces biopuces inclut une étape d'activation préalable de la couche de dendrimères avant de réaliser le couplage avec les oligonucléotides.
30 Cette étape génère une surface réactive qui n'est pas stable dans le temps puisque les auteurs indiquent que les sondes doivent être greffées immédiatement après l'activation. Ceci limite fortement la commercialisation de ce type de support.

Le développement exponentiel de la génomique et de la pharmacogénomique lié au séquençage non seulement du génome humain, mais également à celui d'animaux, de bactéries, de virus, de plantes, etc... amène les laboratoires de recherche académiques ou industriels à consommer de manière massive des biopuces fiables, faciles à fabriquer. La réutilisation est un critère supplémentaire qui permet de valider de manière statistique les essais biologiques. C'est donc afin de remédier à l'ensemble de ces inconvénients et de pourvoir à des biopuces réutilisables pouvant être fabriquées à moindre coût, en peu d'étapes, de manière contrôlée et reproductible et présentant une excellente stabilité et une très bonne sensibilité de détection, que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de l'Invention.

La présente Invention a donc pour premier objet un support solide caractérisé par le fait qu'il comprend au moins une surface fonctionnalisée de façon covalente par des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels et comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, lesdits dendrimères ayant une taille comprise entre 1 et 20 nm.

Dans la suite de la description, de tels supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés sont appelés « dendrilames ».

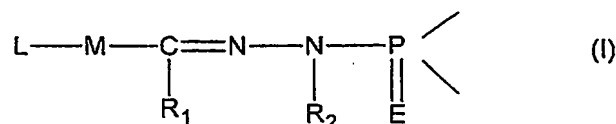
Les dendrimères sont des polymères, isomoléculaires à structure ramifiée et définie, formés d'un noyau central (cœur) à partir duquel sont créées ou greffées des ramifications. Ces ramifications sont multifonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles portent, en particulier en périphérie, plusieurs groupements chimiques fonctionnels, identiques ou différents, choisis selon les propriétés que l'on souhaite conférer au dendrimère. Chaque nouvelle génération est obtenue par introduction d'un nouveau niveau de ramifications. L'ensemble des points de jonctions des branches situés à une égale distance du cœur correspond à une génération. Une représentation schématique d'un dendrimère de génération 4, obtenu à partir d'un cœur trifonctionnel, est donnée sur la figure 1 annexée.

Parmi les dendrimères pouvant être utilisés selon l'Invention, on préfère ceux qui sont constitués :

- d'une couche centrale sous la forme d'un noyau central P_0 , éventuellement phosphoré, comprenant de 2 à 12 groupements fonctionnalisés,

- de n couches intermédiaires, identiques ou différentes, chacune desdites couches intermédiaires étant constituée d'unités P_1 répondant à la formule (I)

5 suivante :



dans laquelle :

L est un atome d'oxygène, de phosphore, de soufre ou d'azote,

M représente l'un des groupes suivants :

- 10
- un groupe aromatique di-, tri- ou tétrasubstitué par des groupes alkyles, des groupes alcoxy, des groupements insaturés du type oléfinique en C_1 - C_{12} , azoïque, acétylénique, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes, ou
 - 15 • un groupe alkyle ou alcoxy comportant plusieurs substituants tels que définis lorsque **M** est un groupe aromatique,

R₁ et **R₂**, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, de soufre, d'azote ou des halogènes avec **R₂** étant le plus souvent différent de **R₁**,

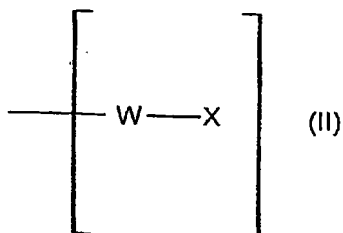
20

n est un nombre entier compris entre 1 et 11,

E est un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, ledit atome d'azote pouvant être lié à un groupe alkyle, alcoxy ou aryle, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

25

- une couche externe constituée d'unités P_2 , identiques ou différentes, et répondant à la formule II suivante :

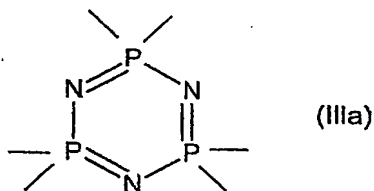


dans laquelle :

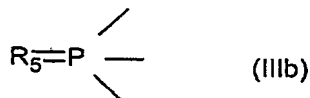
W représente l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, tous ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

X représente un groupement aldéhyde, thiol, amine, époxyde, acide carboxylique, alcool, phénol, et de manière plus générale tout groupement comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre, de carbone ou d'halogène.

De façon préférentielle, le noyau central P_0 de ces dendrimères est sélectionné dans le groupe constitué par le groupement de formule générale IIIa :

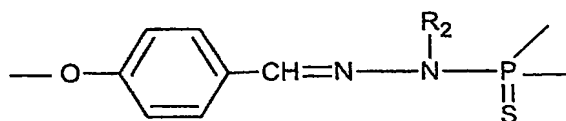


et le groupement de formule générale IIIb :

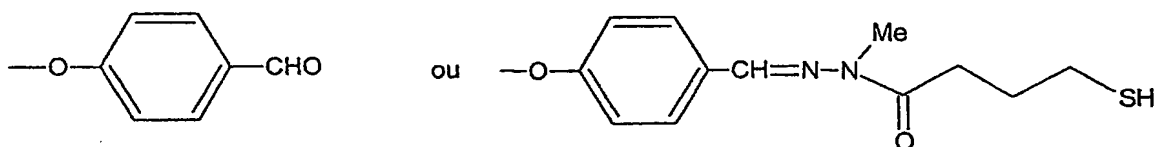


dans lequel R_5 représente un atome de soufre, d'oxygène ou d'azote.

Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, les dendrimères sont choisis parmi les composés dans lesquels le groupe de formule (I) ci-dessus représente le groupe suivant :



dans lequel R_2 représente un radical alkyle en C_1 - C_{12} et plus particulièrement un radical méthyle ;
et le groupe de formule (II) représente l'un des deux groupes suivants :



5

et dans lesquels le nombre de générations varie de préférence entre 1 et 6.

Des exemples de tels dendrimères sont donnés sur les figures 2 et 3 annexées qui représentent respectivement la structure d'un dendrimère de génération 4 à terminaisons aldéhyde et la structure d'un dendrimère de génération 3 à terminaisons thiol.

Parmi les supports solides pouvant être fonctionnalisés conformément à l'Invention, on peut en particulier citer les supports comportant au moins une surface siliciée telle que les lames, les billes et les capillaires en verre, les supports en silicium, en plastique et les supports métalliques tels que par exemple les plots d'or.

Les dendrimères utilisés conformément à l'Invention peuvent être synthétisés de façon connue de l'Homme du métier, par répétition d'une même séquence réactionnelle permettant l'obtention d'une nouvelle génération à la fin de chaque cycle de synthèse et par conséquent d'un nombre croissant de branches et de fonctions périphériques toutes identiques (Tomalia D.A., Ang. Chem. Int. Ed., 1990, 29, 138 ; Launay *et al*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, 33, 1589 et J. Organomet. Chem., 1997, 529, 51).

En particulier, ces dendrimères peuvent être construits étape par étape à partir d'un noyau central possédant au moins deux groupements fonctionnels

25

tel que par exemple l'hexachlorocyclotriphosphazène : $N_3P_3Cl_6$, qui possède six groupements fonctionnels.

De façon plus précise, ces dendrimères sont généralement construits par la répétition de deux étapes à partir du cœur. La première étape est la substitution des atomes de chlore en milieu basique par un composé difonctionnel ayant une fonction alcool et une fonction aldéhyde, par exemple le 4-hydroxybenzaldéhyde. La deuxième étape crée les points de ramification et consiste en une réaction de condensation avec un composé ayant deux types de fonctions : un groupement NH_2 et au moins un groupement PCl_2 comme par exemple le composé $H_2NNMeP(S)Cl_2$. Les deux premières étapes de la méthode de synthèse à partir du cœur hexafonctionnel sont représentées sur le schéma de synthèse A représenté sur la figure 4 annexée.

Une suite itérative des étapes de synthèse permet de construire des dendrimères de génération croissante.

Le tableau I ci-après indique le nombre de fonctions terminales présentes à la périphérie des dendrimères de différentes générations obtenus à partir du cœur N_3P_3 ainsi que leur taille en Angströms :

Tableau I

Génération	Nombre de fonctions	Taille (A)
1	12	30
2	24	45
3	48	60
4	96	75
5	192	90
6	384	105
7	768	120

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un support solide conforme à l'Invention (dendrilame), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de formation d'une liaison covalente entre des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, et la surface fonctionnalisée ou non d'un support solide

pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

Selon une première forme de réalisation du procédé conforme à l'Invention, les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions permettant l'accrochage direct par l'intermédiaire d'une liaison covalente de ces derniers sur la surface non préalablement fonctionnalisée dudit support solide. C'est le cas, en particulier, lorsque les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions thiol et que le support solide comprend une surface d'or.

Selon une seconde forme de réalisation du procédé conforme à l'Invention, et lorsque la surface du support solide utilisé ne comprend pas de fonctions compatibles avec les fonctions périphériques du dendrimères utilisé, il est alors nécessaire de fonctionnaliser préalablement ladite surface au moyen de fonctions aptes à permettre la fixation covalente desdits dendrimères.

Selon cette seconde variante, le procédé conforme à l'Invention est alors caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la fonctionnalisation d'au moins une surface d'un support solide par des fonctions aptes à permettre la fixation de dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface ainsi fonctionnalisée et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt ;

b) la préactivation éventuelle des fonctions du support pour obtenir une surface fonctionnalisée activée,

c) la formation d'une liaison covalente entre lesdits dendrimères et ladite surface fonctionnalisée et éventuellement activée, pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

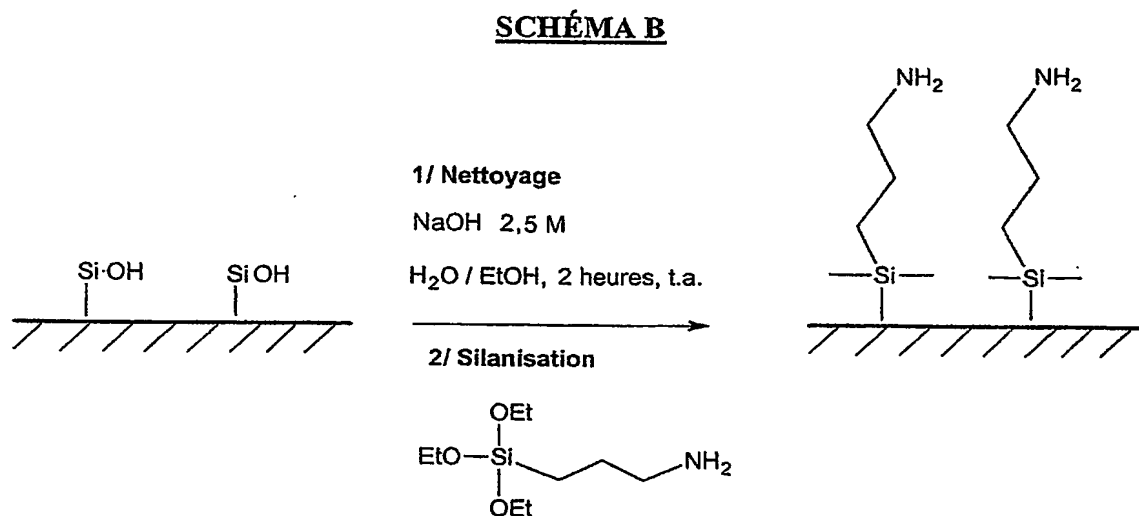
Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, l'étape a) de fonctionnalisation de la surface du support solide est réalisée par silanisation au moyen d'un réactif de silanisation comportant des fonctions aptes à fixer les dendrimères, telles que par exemple des groupements amine.

A titre d'exemple, l'étape de silanisation peut être réalisée en utilisant un réactif de silanisation aminé tel que par exemple le

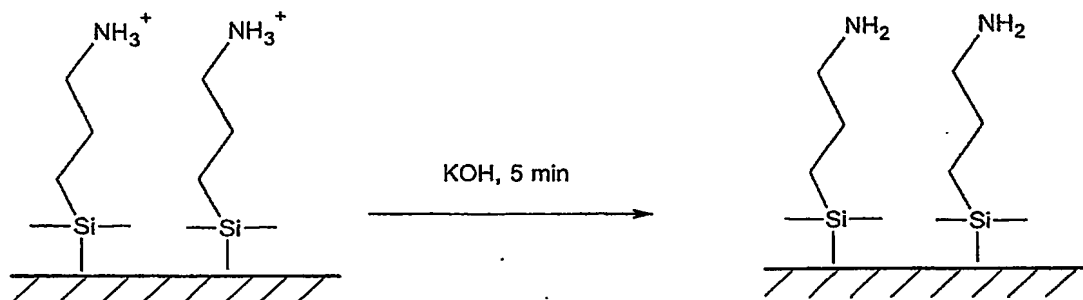
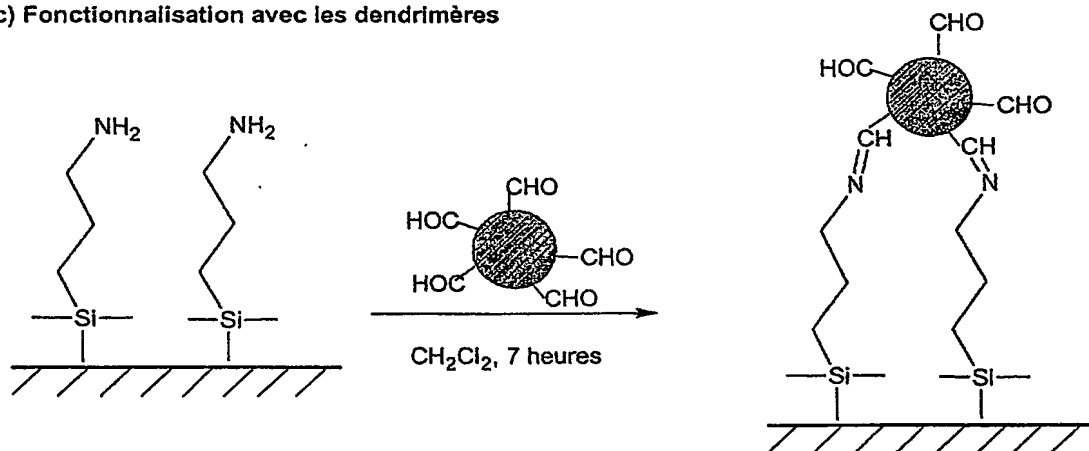
3-aminopropyltriéthoxysilane (Sigma), l'aminopropyldiéthoxyméthylsilane ou bien encore l'aminopropylmonoéthoxydiméthylsilane.

5 Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, l'étape de fixation covalente directe des dendrimères (cas de la première variante) et l'étape a) de silanisation de la surface du support (cas de la deuxième variante) sont précédées d'une étape de nettoyage de la surface du support en milieu basique, acide et/ou oxydant.

10 Dans le cas particulier de la deuxième variante du procédé conforme à l'Invention, ces deux étapes de lavage et de silanisation sont résumées sur le schéma de synthèse B ci-dessous :



15 L'étape b) optionnelle de préactivation sert à réactiver si nécessaire les fonctions amine fixées sur le support à l'issue de l'étape de silanisation. En effet, le stockage, même court, des supports solides aminés peut entraîner une protonation des groupements NH₂. Il est donc souvent préférable de réactiver les fonctions amine en milieu basique avant de faire réagir les dendrimères. Dans ce cas particulier, les étapes b) et c) sont représentés sur le Schéma C ci-après :

SCHEMA C**b) Préactivation****c) Fonctionnalisation avec les dendrimères**

Selon une forme de réalisation avantageuse du procédé conforme à l'Invention, cette étape de préactivation est réalisée par traitement du support à l'aide d'un agent alcalinisant tel que par exemple la potasse, pendant une durée comprise entre 2 et 20 minutes environ.

Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, l'étape de fixation covalente des dendrimères, consiste à :

- préparer une solution desdits dendrimères dans un solvant, tel que par exemple le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane,
- mettre ladite solution de dendrimères en contact avec la surface éventuellement fonctionnalisée et éventuellement activée, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures environ, de préférence entre 2 et 8 heures environ, à une température de préférence comprise entre 4 et 50°C environ.

A l'issue de l'étape de fixation covalente des dendrimères, les supports conformes à l'Invention (dendrilames) sont de préférence rincés puis séchés.

L'étape de rinçage est de préférence réalisée à l'aide d'un solvant organique tel que le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane puis à l'aide d'un alcool
5 inférieur tel que l'éthanol.

Le séchage des dendrilames peut par exemple être effectué à l'air comprimé, sous courant d'azote ou bien encore par centrifugation.

Les dendrilames ainsi obtenues peuvent ensuite être stockées et/ou directement utilisées pour l'immobilisation et/ou la synthèse *in situ* de molécules, en
10 particulier de molécules biologiques.

Les dendrilames conformes à l'Invention peuvent en particulier être stockées pendant au moins deux mois, sans qu'aucune altération des fonctions situées à la périphérie des dendrimères ne se produise.

La présente Invention a donc également pour objet l'utilisation d'un
15 support solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés conformes à l'Invention (dendrilames), comme support pour l'immobilisation et/ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt telles que par exemple des molécules d'acide nucléique (oligonucléotides, produits PCR...), des lipides, des protéines (peptides, enzymes, anticorps, ...) ou leurs partenaires moléculaires.

20 L'Invention a aussi pour objet une biopuce caractérisée par le fait qu'elle est constituée d'un support solide comportant au moins une surface fonctionnalisée par des dendrimères phosphorés sur lesquels sont fixées de façon covalente des molécules d'intérêt telles que des acides nucléiques (oligonucléotides, produits PCR...), des lipides, des protéines (peptides, enzymes, anticorps, ...) ou leurs
25 partenaires moléculaires.

Selon l'Invention, de telles biopuces sont appelées « dendripuces ».

De telles dendripuces possèdent un bruit de fond très bas et une intensité de signal élevée par exemple après hybridation d'acides nucléiques avec des cibles fluorescentes. Ces "dendripuces" présentent l'avantage d'être réutilisables sans
30 perte significative du signal mais surtout sans augmentation du bruit de fond. Ceci entraîne une réduction significative des coûts d'analyse et permet d'obtenir des données statistiques fiables pour une analyse donnée. Ces dendripuces sont de plus

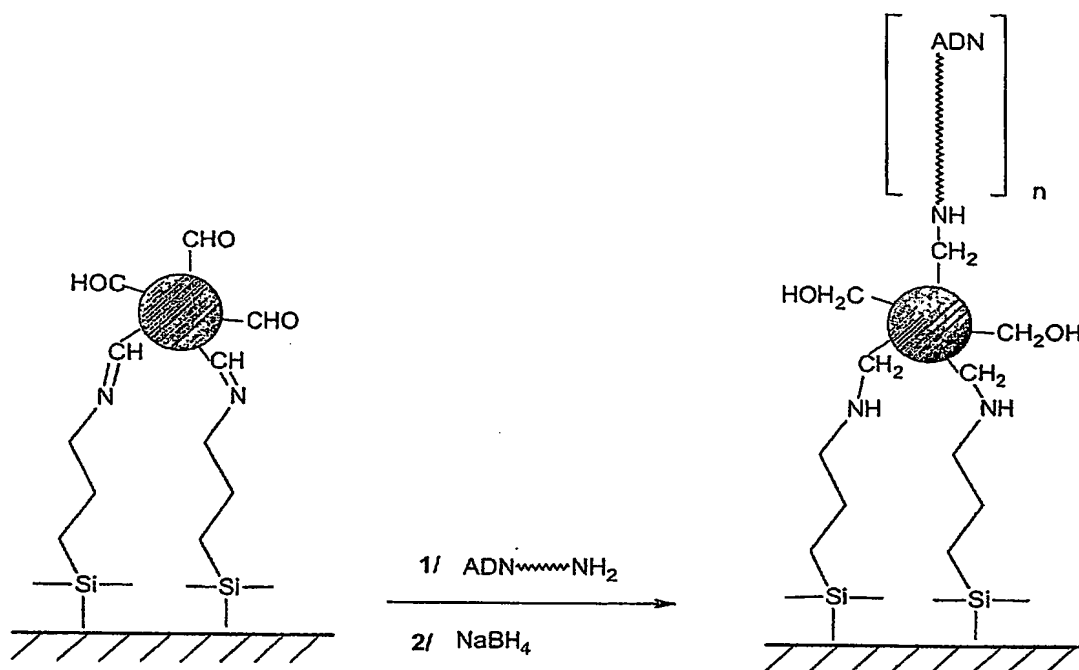
obtenues en peu d'étapes de synthèse (trois à cinq) ; celles-ci se déroulant dans des conditions opératoires non contraignantes, de manière contrôlée et reproductible.

Par ailleurs, du fait de la structure même des dendrimères, ces dendripuces présentent l'avantage de posséder de multiples points d'ancrage sur la surface d'une part et sur les molécules d'intérêt d'autre part, le tout garantissant une
5 excellente stabilité de l'ensemble support-dendrimères-molécules d'intérêt.

Un autre objet de l'Invention est un procédé de préparation d'une dendripuce telle que définie ci-dessus, caractérisé par le fait qu'il consiste à mettre en contact un support solide ayant au moins une surface fonctionnalisée par des
10 dendrimères phosphorés comportant à leur périphérie des fonctions aptes à permettre la fixation covalente de molécules d'intérêt avec une solution tampon renfermant des molécules d'intérêt préalablement fonctionnalisées par, ou comportant déjà, un ou plusieurs groupements aptes à former une liaison covalente avec lesdites fonctions périphériques des dendrimères.

Selon une première forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les
15 fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions aldéhydes, alors les molécules d'intérêt sont de préférence préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine, ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions oxyamine ($-ONH_2$) ou hydrazine
20 ($-NH-NH_2$), et de manière plus générale par toute fonction susceptible de réagir avec une fonction aldéhyde.

Aussi, dans ce cas, les molécules d'intérêt (acides nucléiques aminés, oligonucléotides de tailles variables ou produits PCR), sont déposés sur les "dendrilames" en utilisant, par exemple, le tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Lorsque
25 les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine, cette étape est suivie d'une réduction des fonctions imines présentes entre les acides nucléiques et les dendrimères d'une part et entre les dendrimères et le support d'autre part (voir Schéma D ci-après). Cette étape de réduction permet également de réduire les fonctions aldéhydes résiduelles en alcool
30 rendant la surface hydrophile. De plus, les alcools ne peuvent pas entraîner de réaction non spécifique avec les cibles marquées (pas d'augmentation du bruit de fond).

SCHÉMA D

Selon une deuxième forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions thiol, alors les molécules d'intérêt sont de préférence préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions thiol (pour permettre la création d'un pont disulfure), ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions iodoacétamido ($-\text{NHCO}-\text{CH}_2-\text{I}$), et de manière plus générale, par toute fonction susceptible de réagir avec une fonction thiol. Ce type de fonctionnalisation est particulièrement adapté aux supports solides comportant une surface de type silicium ou en or. Dans le cas d'un lien disulfure établi entre le support et les sondes nucléiques, la surface peut être régénérée par une étape de réduction. La surface thiol ainsi obtenue peut être à nouveau "rechargée" avec d'autres séquences oligonucléotidiques ou avec des protéines.

Selon une troisième forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions amines, alors les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà une ou plusieurs fonctions aldéhyde, α -oxoaldéhyde, $-\text{COOR}$, $-\text{NCS}$, $-\text{NHS}$, et de

manière plus générale, par toute fonction capable de réagir avec une fonction amine.

Selon une quatrième forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions époxyde, alors les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà
5 une ou plusieurs fonctions amine, et de manière plus générale, par toute fonction capable de réagir avec une fonction époxyde.

Selon le procédé de préparation des dendripuces conforme à l'Invention, la réaction de fixation covalente des molécules d'intérêt sur les dendrilames est de préférence réalisée à une température comprise entre 4 et 50°C
10 environ, pendant une durée comprise entre 2 et 24 heures environ.

Les dendripuces ainsi obtenues peuvent avantageusement être utilisées en tant qu'outil de diagnostic miniaturisé, en fonction de la nature des molécules d'intérêt fixées, comme puces à ADN par exemple pour réaliser des réactions d'hybridation avec des cibles complémentaires, comme puces à peptides, à
15 polypeptides ou à protéines par exemple pour la détection de réponses de type antigène-anticorps par l'utilisation de réactifs marqués, fluorescents, radioactifs ou marqués chimiquement.

Les dendripuces conformes à la présente Invention peuvent également être utilisées comme puces à polypeptides pour le criblage de molécules et
20 pour l'analyse des relations entre molécules, de type ligand-récepteur.

De telles dendripuces présentent en particulier l'avantage d'être réutilisables.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à
25 deux exemples de préparation de dendrilames en verre fonctionnalisées par des dendrimères de différentes générations et à extrémités aldéhyde, à un exemple de préparation de biopuces à partir de ces dendrilames, à un exemple d'immobilisation de molécules d'acide nucléique sur des biopuces conformes à l'Invention, à un exemple de synthèse d'un dendrimère de génération 3 et à extrémités thiol et à un exemple de
30 préparation de dendrilames avec des dendrimères de génération 3 à extrémités thiol, ainsi qu'aux figures 1 à 7 dans lesquelles :

- la figure 1 représente une vue schématique d'un dendrimère de

génération 4, obtenu à partir d'un cœur trifonctionnel ;

- la figure 2 représente la formule d'un dendrimère phosphoré de génération 4 comportant des fonctions périphériques terminales aldéhydes ;

5 - la figure 3 représente la formule d'un dendrimère phosphoré de génération 3 à fonctions périphériques terminales thiol ;

- la figure 4 est un schéma de synthèse A représentant les deux premières étapes du procédé de préparation d'un dendrimère à cœur phosphoré ;

10 - la figure 5 représente les images des signaux de fluorescence obtenus après 10 cycles d'hybridation/déshybridation sur des dendripuces conformes à l'Invention ;

- la figure 6 représente les images des signaux de fluorescence obtenus après 10 cycles d'hybridation/déshybridation sur des dendripuces conformes à l'Invention en fonction de la concentration en oligonucléotides cibles ;

15 - la figure 7 représente les images des signaux de fluorescence obtenus lors d'une étude concernant la recherche de mutations sur des oligonucléotides.

EXEMPLE 1 : PRÉPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE CONSTITUE PAR UNE LAME DE VERRE FONCTIONNALISÉE PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORES A EXTRÉMITÉS ALDÉHYDE ("DENDRILAMES")

20 **1) Première étape : Préactivation des lames de verre**

Des lames de verre commerciales, fonctionnalisées par des groupements amine (CORNING®-CMT-GAPS Amino-Silane Coated Slides) sont immergées dans une solution aqueuse de potasse (8 %) pendant 20 minutes sous agitation à l'aide d'un agitateur orbital à une vitesse de 30 rotations par minute
25 (Heidolph Instruments Polymax 1040). Les lames sont ensuite abondamment rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et sont enfin séchées sous courant d'azote.

2) Deuxième étape : Préparation des "dendrilames"

30 Dans cet exemple, trois types de dendrimères différents ont été utilisés :

- Dendrimères G3 : Dendrimères de troisième génération comportant un cœur phosphoré de formule (IIIa) telle que décrite ci-dessus et comportant à leur périphérie 48 fonctions aldéhydes ;

5 - Dendrimères G4 : Dendrimères de quatrième génération comportant un cœur phosphoré de formule (IIIa) telle que décrite ci-dessus et comportant à leur périphérie 96 fonctions aldéhydes ;

- Dendrimères G5 : Dendrimères de cinquième génération comportant un cœur phosphoré de formule (IIIa) telle que décrite ci-dessus et comportant à leur périphérie 192 fonctions aldéhydes ;

10 Les lames préactivées sont immergées dans une solution de dendrimères G3, G4 ou G5 à 0,1% dans du dichlorométhane. Elles sont agitées pendant 6 heures à température ambiante (30 rotations/mn). Elles sont ensuite rincées avec du dichlorométhane (2 lavages de 5 minutes chacun) puis avec de l'éthanol (1 lavage de 5 minutes) et sont enfin séchées sous courant d'azote.

15 On obtient ainsi des lames de verre dont la surface est fonctionnalisée par des dendrimères de G3, G4 ou G5 (dendrilames : DL-A-G3 ; DL-A-G4 et DL-A-G5). Ces dendrilames peuvent ensuite être utilisées pour l'immobilisation de molécules d'intérêt.

20 **EXEMPLE 2 : PRÉPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE CONSTITUÉ PAR UNE LAME DE VERRE FONCTIONNALISÉE PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORÉS A EXTRÉMITÉS ALDÉHYDE ("DENDRILAMES")**

1) Première étape : Nettoyage des lames de verre

25 Des lames de verre commerciales (Gold-Seal-Microslides®, Polylabo) sont placées sur un portoir et celui-ci est immergé dans une solution alcaline de lavage constituée de 50 g de soude dans 200 ml d'eau milliQ et de 300 ml d'éthanol à 95%. Les lames sont agitées pendant 2 heures à température ambiante. Elles sont ensuite abondamment rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et séchées sous courant d'azote ou par centrifugation.

2) Deuxième étape : Silanisation

30 Les lames de verre ainsi nettoyées sont immergées dans une solution de 3-aminopropyltriéthoxysilane (GAPS, Aldrich) à 10 % dans l'éthanol à 95 % et sont placées sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite

laissées pendant 30 minutes à l'air libre, rincées avec de l'éthanol à 95 % (2 lavages de 5 minutes chacun) puis avec de l'eau milliQ (1 lavage de 5 minutes et 1 lavage de 2 minutes avec sonication) avant d'être séchées sous courant d'azote. Elles sont ensuite placées pendant 3 heures à une température de 120°C.

5

3) Troisième étape : Préactivation

Les lames silanisées sont placées dans une solution aqueuse de potasse (8 %) pendant 5 minutes, sous agitation à température ambiante. Elles sont ensuite rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) avant d'être séchées sous courant d'azote.

10

4) Quatrième étape : Fonctionnalisation avec les dendrimères

Les lames préactivées sont placées dans une solution de dendrimères G4 tel que décrit ci-dessus à l'exemple 1 (0,1 % dans du dichlorométhane) pendant 7 heures sous agitation à température ambiante. Elles sont ensuite lavées avec du dichlorométhane (2 lavages de 5 minutes chacun) puis avec de l'éthanol (1 lavage de 5 minutes) avant d'être séchées sous courant d'azote.

15

On obtient ainsi un support solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés à fonctions aldéhydes (dendrilame : DL-B-G4). Cette dendrilame peut ensuite être utilisée pour l'immobilisation de molécules d'intérêt.

20

EXEMPLE 3 : PRÉPARATION DE BIOPUCES A PARTIR DES DENDRILAMES PRÉPARÉES AUX EXEMPLES 1 ET 2 : "DENDRIPUCES"

1) Dépôt des oligonucléotides

a) Oligonucléotides utilisés

Oligonucléotide ON1 : 35 mer-amine ayant la séquence SEQ ID N°1 suivante :

25

5' -GTG-ATC-GTT-GTA-TCG-AGG-AAT-ACT-CCG-ATA-CCA-TT -3', modifié en position 5' par un groupement - NH₂-(CH₂)₆-.

30

Cet oligonucléotide, qui est modifié à son extrémité 5' par un bras à 6 carbones terminé par une fonction amine (Eurogentec, Belgique), permet la réaction avec les fonctions aldéhydes présentes sur la dendrilame telle que décrite ci-dessus aux exemples 1 et 2.

Oligonucléotide ON2 : 35 mer-oxyamine ayant la séquence SEQ ID N°1 décrite ci-dessus et modifié en position 5' par un - H₂NO-(CH₂)₆-.

La séquence SEQ ID N°1 des oligonucléotides ON1 et ON2 correspond à une partie du gène GPH1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les dépôts des oligonucléotides ont été effectués en utilisant le robot Eurogridder® (Eurogentec, Seraing, Belgique) et ont été espacés de 200 µm.

5 b) Dépôts sur les dendrilames

On utilise les dendrilames DL-A-G3, DL-A-G4, DL-A-G5 et DL-B-G4 telles que préparées ci-dessus aux exemples 1 et 2.

Sur les dendrilames DL-A-G3, DL-A-G4, DL-A-G5 préparées à l'exemple 1, les oligonucléotides ON1 sont déposés dans un tampon phosphate 0,3 M (pH 9) contenant des quantités croissantes de diméthylsulfoxyde (DMSO) (0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ou 50 %, v/v) en utilisant le robot Eurogridder® (Eurogentec, Belgique). Les volumes déposés sont de 2 nl et les concentrations varient de 1 µM à 10 µM (1 ; 2 ; 5 et 10 µM). Après dépôt les lames sont laissées pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH₄, 3,5 mg/mL) (étape de réduction des fonctions imines) et sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Elles sont rincées avec de l'eau MilliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et sont séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. On obtient les dendripuces (DP) suivantes DP1-A-G3 ; DP1-A-G4 et DP1-A-G5.

Sur les dendrilames DL-B-G4 préparées à l'exemple 2, les oligonucléotides ON1 sont déposés dans le tampon phosphate 0,3 M (pH 9) en utilisant le robot de dépôt. Les volumes déposés sont de 2 nl et la concentration est de 10 µM. Après dépôt les lames sont laissées pendant une nuit à une température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH₄, 3,5 mg/mL) (étape de réduction des fonctions imines) et sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Elles sont rincées avec de l'eau MilliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et sont séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. On obtient des dendripuces DP1-B-G4.

Les oligonucléotides ON2 ont également été déposés sur les dendrilames préparées à l'exemple 2.

30 Pour ce faire, les oligonucléotides ON2 sont déposés dans l'eau MilliQ. Les volumes déposés sont de 0,2 µl et les concentrations varient de 1 µM à 10 µM (1 µM, 5 µM et 10 µM). Sur la même lame les oligonucléotides ON1 ont été

déposés dans le tampon phosphate 0,3 M dans les mêmes conditions de volume et de concentration. Les lames sont laissées pendant 7 heures à température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH_4 , 3,5 mg/mL) et sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Elles sont ensuite rincées avec de l'eau MilliQ (1 lavage de 5 minutes), avec une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 0,2 % (1 lavage de 5 minutes) et à nouveau avec de l'eau (5 minutes). Elles sont enfin séchées sous courant d'azote. On obtient des dendripuces DP2-B-G4.

On obtient ainsi différentes sortes de biopuces correspondant à des dendrilames sur lesquelles ont été fixés des oligonucléotides ("dendripuces"). Ces dendripuces peuvent ensuite être utilisées dans des réactions d'hybridation.

EXEMPLE 4 : HYBRIDATION

1) Matériel et méthodes

1-a) Tampons utilisés

Les différents tampons utilisés lors des étapes d'hybridation sont reportés ci-dessous ; ils ont été préparés à partir des différentes solutions commerciales suivantes :

- 20 x SSC (citrate de sodium 0,3 M ; NaCl 3 M, pH environ 7 ; Sigma)
- 20 x SSPE (Tampon Phosphate 0,2 M, 2,98 M NaCl, 0,02 M EDTA, pH environ 7,4 ; Sigma),
- 50 x Solution de Denhardt (Sigma),
- ADN saumon (9,9 mg/mL, Sigma).

Tampon d'hybridation : SSPE 2 x, SDS 0,1% [ON cible] = 200 nM, pH 7,4

Avec comme oligonucléotides cibles :

ON-Cy5 : 5' - Cy5 — AAT GGT ATC GGA GTA - 3'

ON-Cy3 : 5' - Cy3 — AAT GGT ATC GGA GTA - 3'

La séquence de ces oligonucléotides cibles correspond à la séquence

SEQ ID N°2.

Tampon de lavage : SSPE 2x, SDS 0,1%, pH 7,4 :

Tampon de déshybridation : 2,5 mM Na_2HPO_4 , 0,1% SDS

1-b) Etape d'hybridation

Les hybridations sont réalisées en ajoutant le volume nécessaire de cibles marquées (de 2 μ l à 40 μ l suivant la surface à couvrir) sur la zone de dépôt de chaque dendripuce.

- 5 Différentes concentrations de cibles à détecter : 200 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM, 2 nM et 1 nM ont été préparées et utilisées au cours des étapes d'hybridation afin d'évaluer la sensibilité de détection des dendripuces conformes à l'Invention.

- 10 La goutte est alors recouverte d'une lamelle et l'ensemble est placé dans une chambre d'hybridation (« CMT-Hybridization Chamber » vendue par la société Corning). Les lames sont laissées pendant 15 minutes à température ambiante et sont ensuite lavées en utilisant le tampon de lavage pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont enfin séchées sous courant d'azote.

1-c) Lecture des lames

- 15 La lecture des lames est réalisée en utilisant un scanner Axon équipé de deux lasers permettant une lecture à des longueurs d'ondes d'excitation de 532 nm et de 635 nm (Cy3 et Cy5 respectivement). La fluorescence émise par les fluorochromes après excitation est détectée par un tube photo-multiplicateur (PMT). Classiquement le PMT a une valeur comprise entre 450 et 600. Le résultat est obtenu sous forme d'un fichier image avec une résolution de 10 μ m/pixel. L'analyse informatique des fichiers images et la quantification de l'intensité de fluorescence ont été réalisées en utilisant le logiciel Genepix®.
- 20

1-d) Etape de déshybridation

- 25 Lorsque la lecture des lames est terminée, on procède à la déshybridation des lames.

- Pour ce faire, les dendripuces sont placées dans un tube Flacon de 50 ml rempli avec le tampon de déshybridation décrit ci-dessus. L'ensemble est placé pendant 5 minutes à 95°C. La lame est alors rincée trois fois avec de l'eau milliQ et séchée par centrifugation ou sous courant d'azote. La lame est ensuite scannée afin de s'assurer que la déshybridation a bien eu lieu. Elle est ainsi prête pour être à nouveau utilisée pour une autre hybridation.
- 30

1-e) Etude de mutations

Dépôts :

L'oligonucléotide ON1 tel que décrit ci-dessus (10 μ M, 2 nl) est déposé sur les dendrilames DL-A-G3, DL-A-G4 ou DL-A-G5 préparées selon l'exemple 1. Les dépôts sont effectués en quatre endroits différents sur la même dendrilame. Les hybridations sont effectuées en utilisant quatre oligonucléotides de 15 bases fonctionnalisés à leurs extrémités 5' par un fluorophore Cy5 et qui contiennent en milieu de séquence les quatre bases possibles T, A, G ou C (Eurogentec). Les séquences de ces oligonucléotides sont les suivantes :

10 - "15mer Cy5 T" (complémentaire) : 5' - Cy5—AAT GGT ATC GGA GTA 3' (SEQ ID N°2)

- "15mer Cy5 A" : 5' - Cy5—AAT GGT AAC GGA GTA 3' (SEQ ID N°3)

- "15mer Cy5 G" : 5' - Cy5—AAT GGT AGC GGA GTA 3' (SEQ ID N°4)

- "15mer Cy5 C" : 5' - Cy5—AAT GGT ACC GGA GTA 3' (SEQ ID N°5)

15 Hybridations

- Tampon d'hybridation : SSC 6x, SDS 0,2%, solution de Denhardt 5x, ADN saumon 10 μ g, pH 7 contenant l'oligonucléotide 15mer Cy5 T, A, G ou C à une concentration de 200 nM.

20 - Tampon de lavage : lavage 1 : SSC 2x, 0,1% SDS, pH 7
lavage 2 : SSC 0,2x.

On dépose 5 μ l de chacune des solutions d'hybridation sur chaque zone de dépôt constituée d'oligonucléotide ON1. On recouvre chaque zone d'une lamelle (sans que les lamelles ne se touchent). On place la lame dans une chambre d'hybridation (Corning) que l'on plonge dans un bain à 42°C pendant une heure. Les lames sont ensuite lavées avec le tampon de lavage 1 pendant 5 minutes à température ambiante ou à 50°C puis avec le tampon de lavage 2 pendant 5 minutes à 50°C. Elles sont enfin séchées sous courant d'azote.

2) Résultats

2-a) Réutilisation des dendriputes et sensibilité de la détection en fonction de la nature du tampon de dépôt, de la concentration en ON et de la nature des dendrimères

5 Sur les dendriputes DP1-A-G3, DP1-A-G4 et DP1-A-G5, et pour chaque concentration testée de cibles à détecter, les étapes d'hybridation, de lecture des lames et de déshybridation ont été effectuées 7 fois avec l'ON 15-mer Cy5 (200 nM), afin de démontrer le caractère réutilisable des dendriputes conformes à l'Invention, ainsi que la sensibilité et la reproductibilité des résultats obtenus. Les
10 valeurs d'intensité de fluorescence sont regroupées dans les Tableaux II à IV ci-après ; le PMT a valeur de 600 et les dépôts ont été réalisés en triplicata pour chaque tampon :

15

20

25

30

TABLEAU II

DP1-A-G3 : APRÈS LA PREMIÈRE HYBRIDATION					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/200	0	100	65000/200
10	110	65000/200	10	110	65000/200
20	110	65000/200	20	140	65000/200
30	140	65000/200	30	140	65000/200
40	140	65000/200	40	150	65000/200
50	160	42000/200	50	160	50000/200
APRÈS SEPT HYBRIDATIONS					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/300	0	100	65000/350
10	110	65000/300	10	110	65000/350
20	110	65000/300	20	140	65000/350
30	140	65000/300	30	140	65000/350
40	140	65000/300	40	150	65000/350
50	160	50000/300	50	160	50000/350

TABLEAU III

DP1-A-G4 : APRÈS LA PREMIÈRE HYBRIDATION					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/300	0	100	65000/300
10	120	65000/300	10	110	65000/300
20	120	53000/300	20	110	65000/300
30	140	65000/300	30	170	65000/300
40	160	65000/300	40	190	65000/300
50	170	53000/200	50	180	65000/200
APRÈS SEPT HYBRIDATIONS					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/300	0	100	65000/350
10	110	65000/300	10	110	65000/350
20	110	56000/300	20	140	45000/350
30	140	52000/300	30	140	65000/350
40	140	65000/300	40	150	65000/350
50	160	48000/300	50	160	51000/350

TABLEAU IV

DPI-A-G5 : APRÈS LA PREMIÈRE HYBRIDATION					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	100	65000/200	0	90	65000/200
10	110	65000/200	10	100	65000/200
20	130	65000/200	20	120	45000/200
30	160	38000/200	30	170	65000/200
40	170	65000/200	40	180	65000/200
50	180	47000/200	50	170	48000/200
APRÈS SEPT HYBRIDATIONS					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/500	0	100	65000/500
10	110	65000/500	10	110	65000/500
20	110	56000/500	20	140	45000/500
30	140	52000/500	30	140	65000/500
40	140	60000/500	40	150	62000/500
50	160	42000/500	50	160	60000/500

5 Ces résultats montrent que les rapports signal/bruit sont pratiquement constants entre la première et la septième hybridation. Ces résultats démontrent que les dendriputes conformes à l'Invention peuvent être réutilisées sans diminution du rapport signal/bruit.

De plus, ces résultats montrent que les rapports signal/bruit obtenus avec les différentes concentrations de tampon sont très proches et donc significatifs de la reproductibilité et de la sensibilité des mesures.

De la même manière, 10 cycles d'hybridation et de déshybridation ont été réalisés sur les dendriputes DP1-B-G4 telles que préparées ci-dessus à l'exemple 2.

Les résultats obtenus, sous la forme d'images des signaux de fluorescence, sont représentés sur la figure 5.

Ces résultats montrent que le rapport signal/bruit après la première hybridation (65000/200) est le même après la dixième hybridation et donc significatif du caractère réutilisable des dendriputes conformes à la présente Invention.

2-b) Réutilisation des dendriputes et sensibilité de la détection en fonction de la concentration en ON cible et de la nature des dendrimères

L'oligonucléotide ON1 a été déposé en cinq endroits différents sur les dendriputes DP1-A-G3, DP1-A-G4 et DP1-A-G5 telles que préparées à l'exemple 3 ci-dessus.

Les solutions d'hybridation suivantes contenant des concentrations décroissantes en ON-Cy5 cible ont été utilisées afin d'évaluer la sensibilité des dendriputes conformes à l'Invention :

- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON- Cy5] = 200 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 100 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 20 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 10 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 2 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 1 nM

2 µl de chacune de ces solutions d'hybridation ont ensuite été déposés sur les dendriputes et laissés incuber pendant 15 minutes à température ambiante. Les dendriputes ont ensuite été lavées avec le tampon SSPE 2x, SDS 0,1% pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. 10 cycles d'hybridation/déshybridation ont ainsi été effectués.

Les images obtenues sont représentées sur la figure 6.

Ces résultats montrent que pour une concentration en ON-Cy5 cible variant entre 200 nM et 10 nM, et même après 10 cycles d'hybridation/déshybridation, on obtient un rapport signal/bruit constant de 65000/200. Pour une concentration en ON-Cy5 cible inférieure, c'est-à-dire de 2nM ou de 1nM, on obtient des rapports signal/bruit respectivement de 50000/200 et de 40000/200 significatifs de la très bonne sensibilité de détection des dendripuces conformes à l'Invention et de la reproductibilité des résultats qu'elles permettent d'obtenir lorsqu'elles sont réutilisées plusieurs fois.

2-b) Détection de mutations

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 7 annexée sur laquelle on peut voir que seul l'oligonucléotide parfaitement complémentaire conduit à l'obtention d'un signal de fluorescence alors qu'aucun signal de fluorescence n'est obtenu avec les oligonucléotides contenant une mutation en milieu de chaîne. Les dendripuces conformes à l'Invention permettent donc de détecter des mutations.

15 EXEMPLE 5 : SYNTHÈSE D'UN DENDRIMÈRE DE GÉNÉRATION 3 A EXTRÉMITÉS THIOLS

1) Première étape : Synthèse d'un dendrimère de génération 3 à extrémités NH(Me)

A une solution de dendrimère de génération 3 (cœur N_3P_3 , Launay *et al.*, pré-cité) à extrémités aldéhydes (650 mg) dans le dichlorométhane est ajoutée, à la seringue, un léger excès de monométhylhydrazine (224 μ l). Après quatre heures d'agitation à température ambiante le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis le dendrimère de génération 3 à extrémités NH(Me) est précipité en utilisant du diéther (3x15 ml). La poudre blanche résultante est lavée plusieurs fois avec ce solvant avant d'être séchée sous pression réduite.

2) Deuxième étape : Synthèse d'un dendrimère de génération 3 à extrémités thiols

Le dendrimère de génération 3 à extrémités NH(Me) obtenu à l'étape 1) ci-dessus (1 g) est dissous dans 2,5 ml de γ -thiobutyrolactone dans un tube de Schlenk. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 3 jours à 50-55°C sous pression autogène. Après refroidissement, le brut réactionnel est lavé avec 3x50 ml de

diéthyléther pour donner un dendrimère de génération 3 possédant 48 fonctions thiols à sa périphérie.

Ce dendrimère, qui est représenté sur la figure 3 annexée, peut ensuite être utilisé pour la fabrication des dendrilames conformes à l'Invention.

- 5 Remarque : cette procédure est générale et permet d'obtenir des dendrimères à extrémités thiols de toutes les générations (Schmid *et al*, Chem. Eur. J., 2000, 6, 1693).

EXEMPLE 6 : PRÉPARATION DE "DENDRILAMES" FONCTIONNALISÉES PAR DES DENDRIMÈRES A EXTRÉMITÉS THIOLS

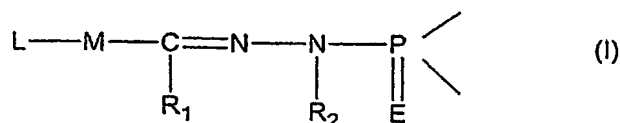
- 10 Des lames en SiO₂, SiO₂ silanisées ou SiN_x sur lesquelles sont fixés des plots d'or (10 µm² à 500 µm²) sont préalablement lavées avec de l'éthanol à 95 % et séchées à l'air comprimé. Elles sont ensuite plongées pour des durées variables (15 minutes, 1 heure, 2 heures et 12 heures) dans une solution constituée de 100 µg de dendrimères de génération 3 à extrémités thiols tel que préparé ci-dessus à l'exemple
- 15 5 dissous dans 5 ml de THF distillé. Les lames sont ensuite lavées avec du THF distillé (± ultrasons) puis avec de l'éthanol avant d'être séchées à l'air comprimé. Le résultat du greffage (non représenté) est observé par microscopie à force atomique (AFM). Dans le cas des plots d'or sur support SiO₂, le greffage des dendrimères G3-thiols est non sélectif (fixation à la fois sur l'or et sur le support SiO₂). Dans le cas
- 20 des supports SiO₂ silanisés ou SiN_x, le greffage des dendrimères G3-thiols se fait sélectivement sur les plots d'or. On obtient ainsi des lames en silicium/or dont la surface est fonctionnalisée par des dendrimères-thiol de génération 3 (dendrilames : DL-C-G3'). Ces dendrilames peuvent ensuite être utilisées pour l'immobilisation de molécules d'intérêt.

REVENDEICATIONS

1. Support solide caractérisé par le fait qu'il comprend au moins une surface fonctionnalisée de façon covalente par des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels et comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, lesdits dendrimères ayant une taille comprise entre 1 et 20 nm.

2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les dendrimères sont choisis parmi ceux qui sont constitués :

- d'une couche centrale sous la forme d'un noyau central P_0 , éventuellement phosphoré, comprenant de 2 à 12 groupements fonctionnalisés,
- de n couches intermédiaires, identiques ou différentes, chacune desdites couches intermédiaires étant constituée d'unités P_1 répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

L est un atome d'oxygène, de phosphore, de soufre ou d'azote,

M représente l'un des groupes suivants :

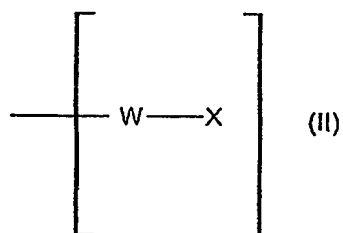
- un groupe aromatique di-, tri- ou tétrasubstitué par des groupes alkyles, des groupes alcoxy, des groupements insaturés du type oléfinique en C_1-C_{12} , azoïques, acétylénique, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes, ou
- un groupe alkyle ou alcoxy comportant plusieurs substituants tels que définis lorsque **M** est un groupe aromatique,

R₁ et **R**₂, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, de soufre, d'azote ou des halogènes avec **R**₂ étant le plus souvent différent de **R**₁,

n est un nombre entier compris entre 1 et 11,

E est un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, ledit atome d'azote pouvant être lié à un groupe alkyle, alcoxy ou aryle, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

- 5 - une couche externe constituée d'unités P_2 , identiques ou différentes, et répondant à la formule II suivante :

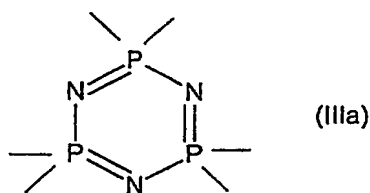


dans laquelle :

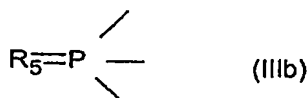
- 10 W représente l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, tous ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

X représente un groupement aldéhyde, thiol, amine, époxyde, acide carboxylique, alcool ou phénol.

- 15 3. Support solide selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le noyau central P_0 est sélectionné dans le groupe constitué par le groupement de formule générale IIIa :

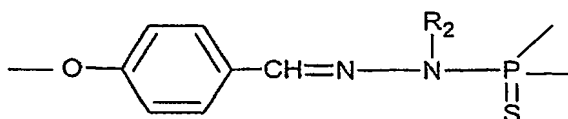


et le groupement de formule générale IIIb :

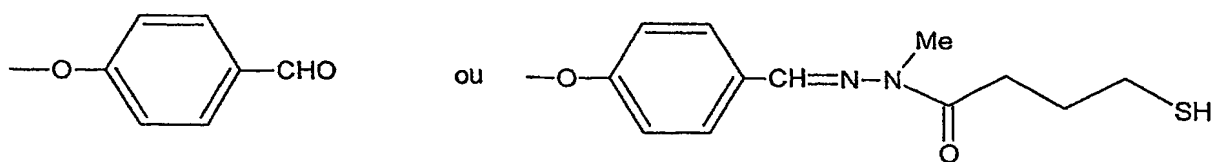


- 20 dans lequel R_5 représente un atome de soufre, d'oxygène ou d'azote.

4. Support selon la revendication 2 ou 3, caractérisé par le fait que les dendrimères sont choisis parmi les composés dans lesquels le groupe de formule (I) représente le groupe suivant :



5 dans lequel R₂ représente un radical alkyle en C₁-C₁₂ et plus particulièrement un radical méthyle ;
et le groupe de formule (II) représente l'un des deux groupes suivants :



et dans lesquels le nombre de générations varie de préférence entre 1
10 et 6.

5. Support solide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi les supports comportant au moins une surface siliciée telle que les lames, les billes et les capillaires en verre, les supports en silicium, en plastique et les supports métalliques.

15 6. Procédé de préparation d'un support solide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de formation d'une liaison covalente entre des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur
20 fixation sur ladite surface et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, et la surface fonctionnalisée ou non d'un support solide pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

25 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions permettant l'accrochage direct par l'intermédiaire d'une liaison covalente de ces derniers sur la surface non préalablement fonctionnalisée dudit support solide.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions thiol et que le support solide comprend une surface d'or.

5 9. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la surface du support solide utilisé ne comprend pas de fonctions compatibles avec les fonctions périphériques du dendrimère utilisé, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

10 a) la fonctionnalisation d'au moins une surface d'un support solide par des fonctions aptes à permettre la fixation de dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface ainsi fonctionnalisée et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt ;

15 b) la préactivation éventuelle des fonctions du support pour obtenir une surface fonctionnalisée activée,

c) la formation d'une liaison covalente entre lesdits dendrimères et ladite surface fonctionnalisée et éventuellement activée, pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

20 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que l'étape a) de fonctionnalisation de la surface du support solide est réalisée par silanisation au moyen d'un réactif de silanisation comportant des fonctions aptes à fixer les dendrimères, telles que par exemple des groupements amine.

11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé par le fait que le réactif de silanisation est aminé.

25 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé par le fait que l'étape de préactivation est réalisée par traitement du support à l'aide d'un agent alcalinisant, pendant une durée comprise entre 2 et 20 minutes.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, caractérisé par le fait que l'étape de fixation covalente des dendrimères, consiste à :

30 - préparer une solution desdits dendrimères dans un solvant,

- mettre ladite solution de dendrimères en contact avec la surface éventuellement fonctionnalisée et éventuellement activée, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 13, caractérisé par le fait qu'à l'issue de l'étape de fixation covalente des dendrimères, les supports sont rincés puis séchés.

15. Utilisation d'un support solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 5, comme support pour l'immobilisation et/ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée par le fait que les molécules d'intérêt sont des molécules d'acide nucléique, des lipides, des protéines ou leurs partenaires moléculaires.

17. Biopuce ou dendripuce caractérisée par le fait qu'elle est constituée d'un support solide comportant au moins une surface fonctionnalisée par des dendrimères phosphorés et tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5, sur lesquels sont fixées, de façon covalente, des molécules d'intérêt.

18. Biopuce selon la revendication 17, caractérisée par le fait qu'elle est réutilisable.

19. Procédé de préparation d'une biopuce telle que définie à la revendication 17 ou 18, caractérisé par le fait qu'il consiste à mettre en contact un support solide ayant au moins une surface fonctionnalisée par des dendrimères phosphorés et comportant à leur périphérie des fonctions aptes à permettre la fixation covalente de molécules d'intérêt avec une solution tampon renfermant des molécules d'intérêt préalablement fonctionnalisées par, ou comportant déjà, un ou plusieurs groupements aptes à former une liaison covalente avec lesdites fonctions périphériques des dendrimères.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions aldéhydes, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine, ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions oxyamine ($-ONH_2$) ou hydrazine ($-NH-NH_2$).

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé par le fait que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine et que l'étape de fixation des molécules d'intérêt est suivie d'une étape de réduction des fonctions imines.

5 22. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions thiol, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions thiol ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions iodoacétamido ($-\text{NHCO}-\text{CH}_2-\text{I}$).

10 23. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions amines, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions aldéhyde, α -oxoaldéhyde, $-\text{COOR}$, $-\text{NCS}$ ou $-\text{NHS}$.

15 24. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions époxyde, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine.

20 25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 24, caractérisé par le fait que la réaction de fixation covalente des molécules d'intérêt sur les dendrilames est réalisée à une température comprise entre 4 et 50°C, pendant une durée comprise entre 2 et 24 heures.

26. Utilisation d'une dendripuce selon la revendication 17 ou 18 comme puces à ADN, à peptides, à polypeptides ou à protéines.

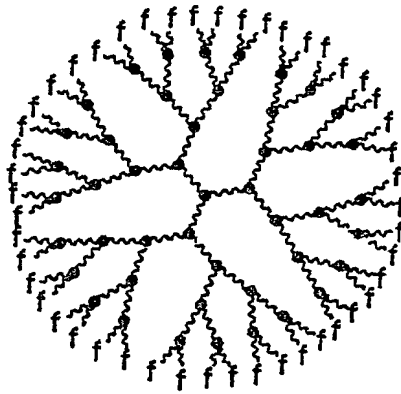


Figure 1

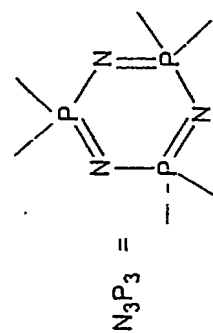
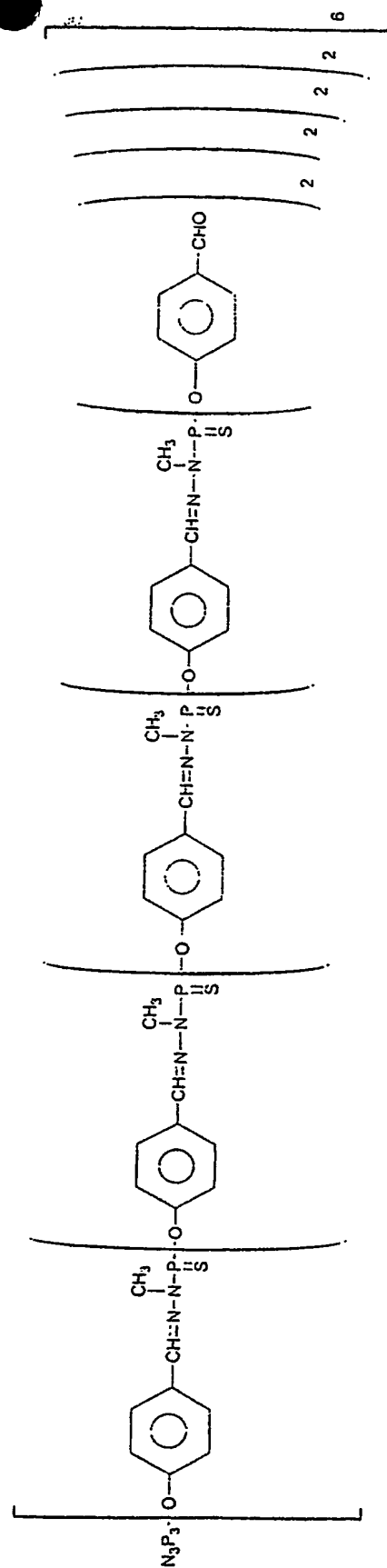


FIGURE 2

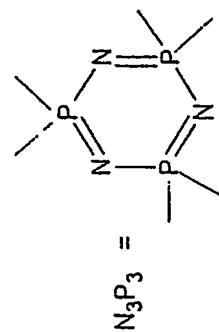
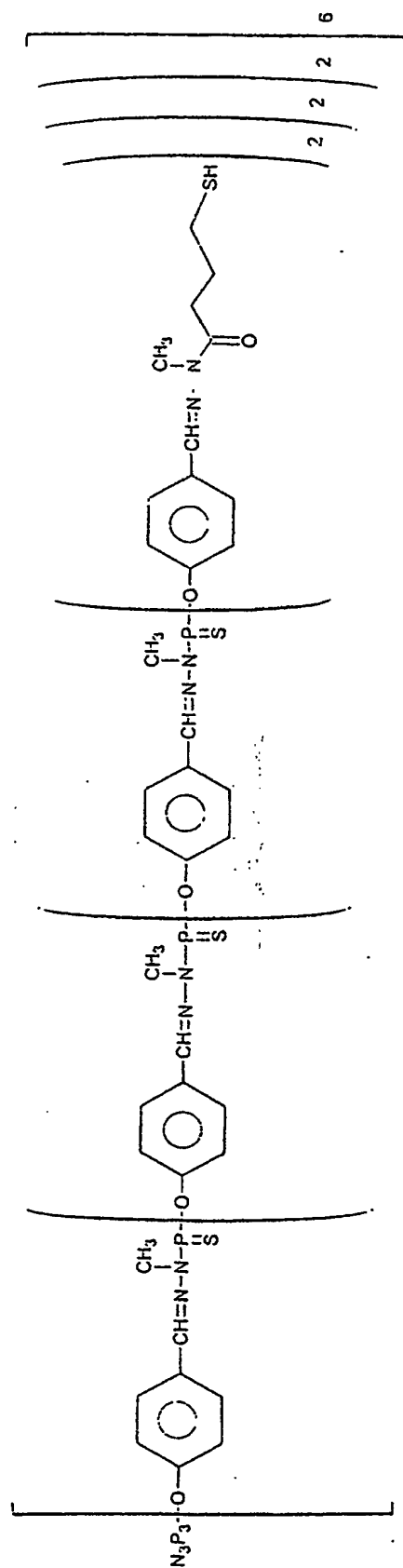


FIGURE 3

SCHEMA DE SYNTHESE A

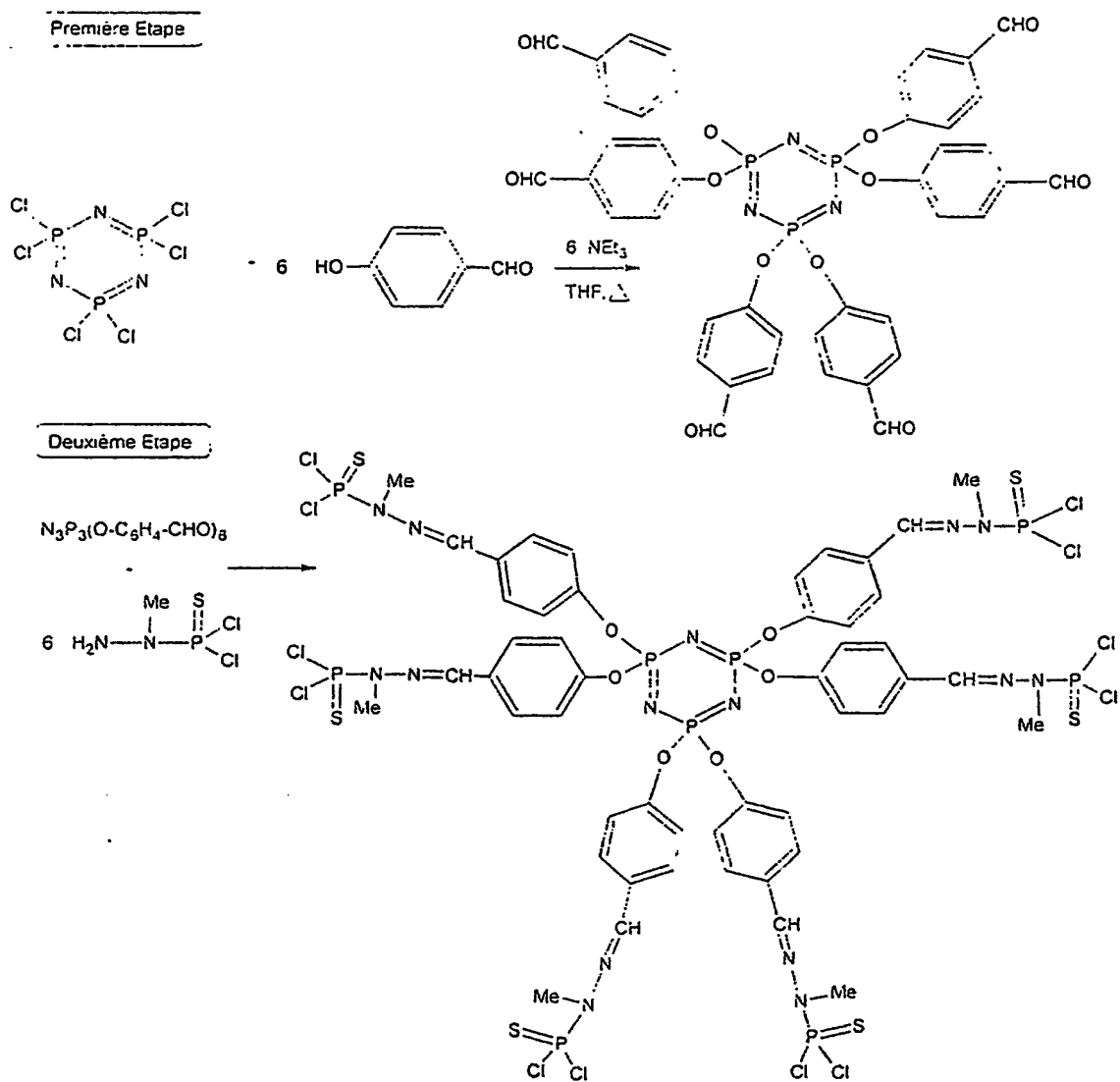


FIGURE 4

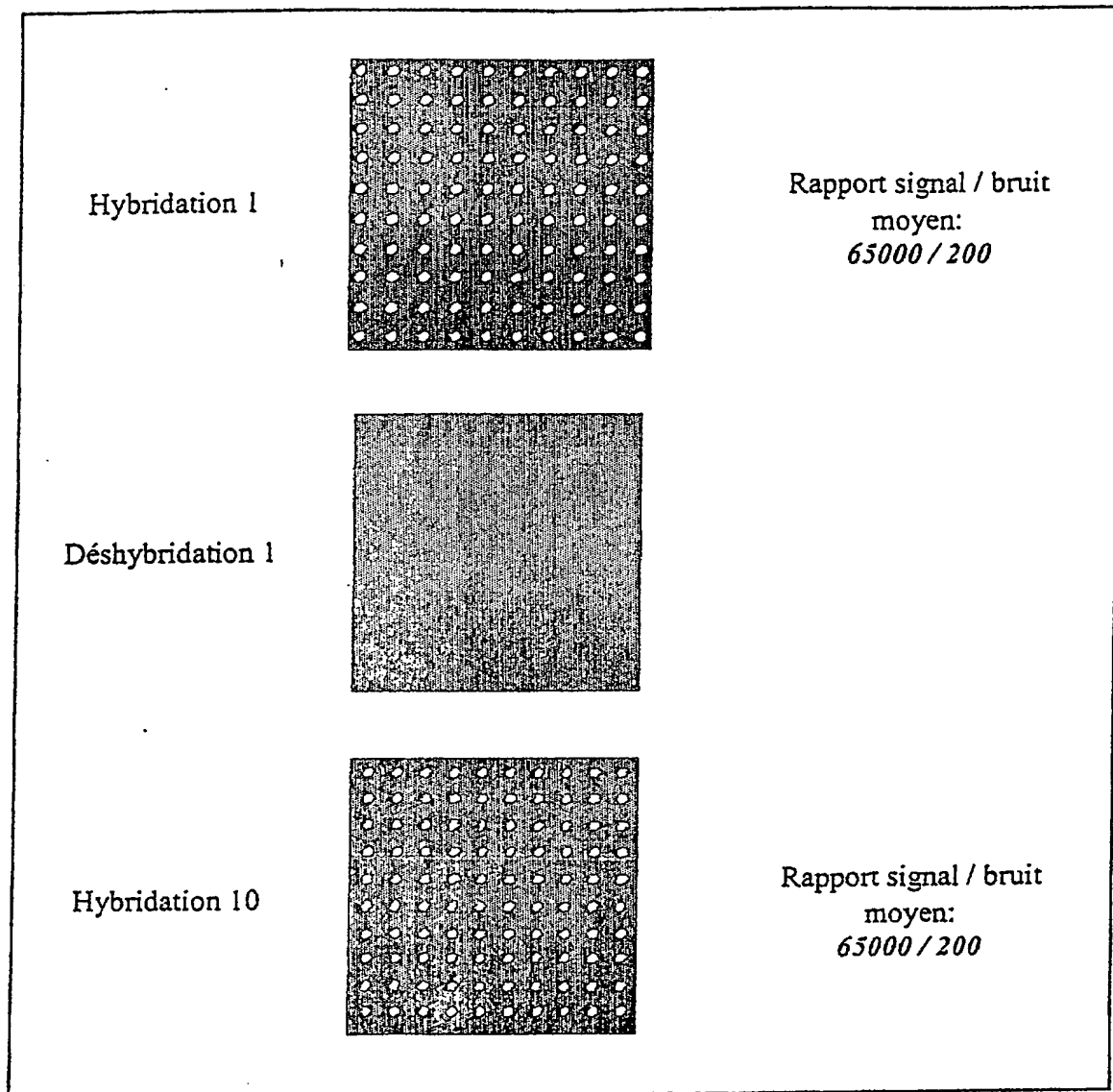


Figure 5

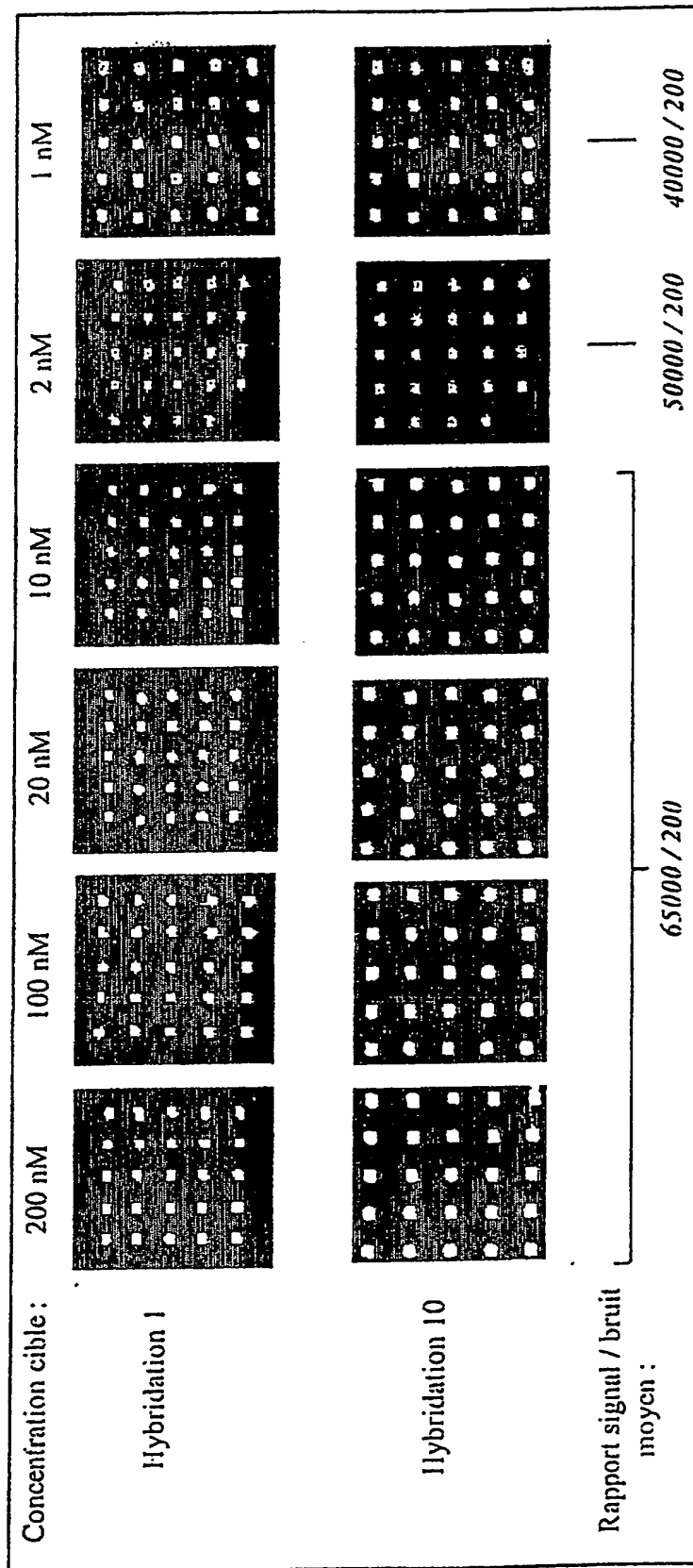


Figure 6

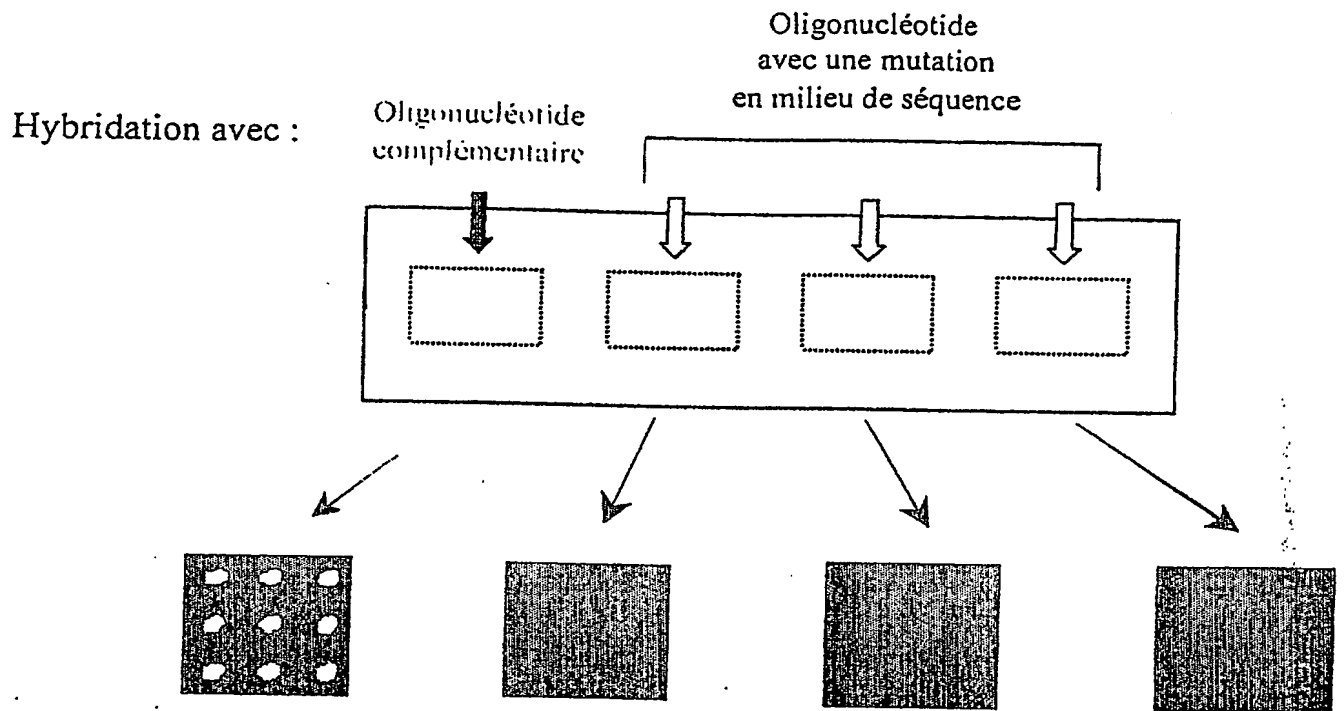


Figure 7

LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISES PAR DES DENDRIMERES
PHOSPHORES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS

<130> SGimF644cas73

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 35

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

gtgatcggttg tatcgaggaa tactccgata ccatt

35

<210> 2

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 2

aatggtatcg gagta

15

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Description de la séquence
artificielle : oligonucléotide

<400> 3

aatggtaacg gagta

15

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 4
aatggtagcg gagta

15

<210> 5
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide

<400> 5
aatggtaccg gagta

15

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg


75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 3..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260599

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGimF644/73FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0205045	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISÉS PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORES, LEUR PROCÉDE DE PRÉPARATION ET APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel Ange 75016 PARIS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		TREVISIOL	
Prénoms		Emmanuelle	
Adresse	Rue	16, Vieux Chemin de Blagnac	
	Code postal et ville	31700	CORNEBARRIEU
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LECLAIRE	
Prénoms		Julien	
Adresse	Rue	15, rue Velane	
	Code postal et ville	31000	TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		PRATVIEL	
Prénoms		Geneviève	
Adresse	Rue	8 chemin Savit	
	Code postal et ville	31100	TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N°92-4046			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 3..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 W / 260893

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGimF644/73FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0205043	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISÉS PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORÉS, LEUR PROCÉDE DE PRÉPARATION ET APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel Ange 75016 PARIS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CAMINADE	
Prénoms		Anne-Marie	
Adresse	Rue	17, rue de l'Esterel	
	Code postal et ville	31400	TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FRANCOIS	
Prénoms		Jean	
Adresse	Rue	3, place Albert Camus	
	Code postal et ville	31320	CASTANET TOLOSAN
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MAJORAL	
Prénoms		Jean-Pierre	
Adresse	Rue	11 allée Montcalm	
	Code postal et ville	31520	RAMONVILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N°92-4046			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

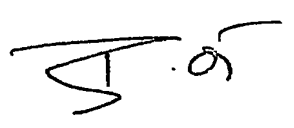
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3../3..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260999

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGimF644/73FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0205049	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISÉS PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORES, LEUR PROCÉDE DE PRÉPARATION ET APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel Ange 75016 PARIS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MEUNIER	
Prénoms		Bernard	
Adresse	Rue	7 impasse des Meuniers	
	Code postal et ville	31320	CASTANET
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N°92-4046			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.